

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590289

研究課題名（和文） アンチエイジングの受容体薬理学ゲノミクス解明による創薬研究

研究課題名（英文） Drug development using accelerated aging model

研究代表者

奥水 崇鏡（Koshimizu Taka-aki）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20392491

研究成果の概要（和文）：

臨床的に注目されているサブクリニカルな副腎皮質機能亢進症に対し、副腎皮質の予備能のみが低下した場合の病態について詳細は未だ明らかでなく、病態の機序解明には適切な病態モデルが不可欠である。本研究では V1a 受容体遺伝子を特異的に発現する副腎皮質細胞と V1a 受容体を特異的に欠失させた遺伝子改変マウス（V1a^{-/-}）を用い、これまで明らかにされていなかった副腎皮質細胞の V1a 受容体の役割を検討した。V1a 受容体はステロイドの分泌を亢進させ、細胞の増殖と加齢変化に関わることが判明した。本研究で得られた知見は、今後の発展性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Vasopressin is known to promote cellular growth and protein synthesis in adrenocortical and other cell types. We examined the role of V1a receptor in steroid secretion and cellular aging in adrenal cortex. In adrenocortical cell line, vasopressin promoted glucocorticoid secretion when applied alone or together with adrenocortical hormone. This study also found that V1a knockout mouse is an excellent model for studying aging in adrenocortical cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：バゾプレッシン、リボフスチン、副腎皮質、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

下垂体抽出物が強力な昇圧作用を示すことが 1895 年に Oliver と Schäfer によって報告され、バゾプレッシンと命名された。バゾプレッシンは、血圧作用する濃度よりも低濃度から腎集合管に作用し、抗利尿効果を発揮することが明らかとなり、抗利尿ホルモンとも呼ばれる。すなわち下垂体後葉ホルモンバゾプレッシンは、腎臓集合管での水再吸収に関わる V2 受容体とは別に、血管平滑筋に存在する V1a 受容体を介して強力な血管収縮と昇圧を惹起する。バゾプレッシン受容体 (V1a, V1b, V2) の中で V1a および V1b 受容体は生理機能並びに病態における役割に不明な点が多かったが、近年の遺伝子改変マウスの作出と解析により、V1 受容体を介した循環機能を含む多くの生理機能調節の新たな仕組みが明らかとなりつつある。しかし、V1a 受容体の機能が代謝調節を通じて加齢現象、肥満や脂質代謝に関わるか否か、特に病態における役割は未だ十分に明らかではない。

9つのアミノ酸からなるバゾプレッシンは、同様に下垂体後葉ホルモンであるオキシトシンとともに類縁の遺伝子ファミリーを形成する。バゾプレッシンとオキシトシンは互いに類似のアミノ酸配列を持ち、9アミノ酸中2箇所のみが異なる。この構造的な類似性により、バゾプレッシンの生理作用はGタンパク質受容体ファミリーに属する3種類のバゾプレッシン受容体サブタイプ V1a, V1b, V2 だけでなく、オキシトシン受容体に対してもアゴニスト活性を有する。これら受容体にそれぞれ代表的な発現組織として、V1a は血管平滑筋、V1b は下垂体前葉コルチコトロピン (ACTH) 分泌細胞、V2 は腎集合管細胞が挙げられる。オキシトシン受容体はヒトやげっ歯類で1種類のみ知られる。クローニングしたバゾプレッシン受容体 cDNA を個別に発現する細胞を刺激した際、効力に差はみられるも

のバゾプレッシンとオキシトシンの両方に対して反応が観察される。バゾプレッシン受容体を介する主な細胞内シグナル伝達経路は、V1a 及び V1b 受容体は Gq タンパク質を介しフォスホリパーゼ C を活性化し、細胞内イノシトール 3 リン酸とジアシルグリセロールの産生、細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起し、V2 受容体の活性化は Gs タンパク質を活性化し細胞内 cyclicAMP を上昇させる。また各受容体とも G タンパク質を介さずに、代わりに β アレスチンを情報伝達分子とする経路の役割が判明しつつある。

それぞれの受容体サブタイプの全身における発現分布は中枢を含む多くの組織で重なっており、受容体サブタイプに特異的な機能を同定することは特に V1 受容体では困難を伴う。近年、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は受容体タンパク質モノマーが2つ以上で複合体 (ダイマーあるいはオリゴマー) を形成し機能することが判明し、この受容体ファミリーが機能的な多様性を示す一因となることが示唆された。培養細胞に発現させた場合、V1a と V2 は各々の単体からなる二量体 (V1a-V1a や V2-V2) をするとともに、これらの受容体を共発現する細胞では V1a-V2 異種複合体を形成する。さらに、V1a-OTR オキシトシン受容体間でも定常状態において受容体複合体が形成される。一般に GPCR は異種複合体の形成によってリガンドの結合や細胞内への情報伝達様式、細胞内局在、脱感作の感受性などが変化し得ることが知られ、循環機能に関わる $\beta 1$ - $\beta 2$ アドレナリン受容体複合体や $\beta 1$ アドレナリン-AT1 アンギオテンシン受容体複合体などは薬物の標的としても重要と考えられている。よって生体内で特定のバゾプレッシン受容体サブタイプの役割を明らかにすることは容易でなく、受容体特異的な薬理的ツールと受容体あるいはリガンド遺

伝子の改変動物を組み合わせて理解を進める必要がある。

バゾプレッシンが作用する3種類の受容体のうちV1a受容体遺伝子を欠失させたマウスは副腎皮質への加齢色素沈着が早期より観察される。これによりグルココルチコイドの分泌予備能が低下し循環血液量が低下する一因となっている。野生型と変異型マウス副腎を用いた網羅的発現解析より酸化還元反応系の異常が示唆された。本研究の成果より、バゾプレッシンの新たなステロイドホルモン分泌調節機能を明らかにするとともに、新たな加齢色素沈着のメカニズム解明につながると期待される。ステロイドホルモンの作用は多岐に渡り副腎皮質機能不全症あるいは亢進症の影響は全身性及ぶ。最近では本態性高血圧症とされていた患者の中にサブクリニカルな副腎皮質機能亢進症が存在することが明らかになっている。しかし反対に副腎皮質の予備能のみが低下した場合の病態について詳細は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

一方バゾプレッシンが作用する3種類のサブタイプ受容体は体内に広く分布しバゾプレッシンの多様な機能の発現を司る。本研究ではV1a受容体遺伝子を特異的に欠失させた遺伝子改変マウス(V1a^{-/-})を用い、これまで明らかにされていなかった副腎皮質細胞の加齢色素沈着におけるV1a受容体の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 遺伝子改変動物 V1a遺伝子、V1b遺伝子改変マウスは以前の報告のごとく維持繁殖した。このマウスの遺伝背景は129/SVとBlack/6Jを両方持つため、同系の野生型マウスをコントロールに用いた。

3-2. 細胞培養 マウス株化副腎皮質細胞であるY1細胞をRPMI-1640培地(10%FCS、50U/ml penicillin、0.1mg/ml streptomycin含有)中で37°C、5%CO₂存在下でそれぞれ培養した。細胞(5x10⁵ cells/ml)をACTH 10 nM-1mM、Vasopressin 1 μMを添加した培養液中で一定時間培養し、ホルモン分泌能を解析した。

マウスV1a受容体またはマウスオキシトシン受容体安定発現CHO細胞を樹立した。まず10 cmの細胞培養用ディッシュに撒いたCHO細胞にオキシトシン受容体またはV1aバゾプレッシン受容体の発現用プラスミドをFugene 6 トランスフェクション用試薬を用いてトランスフェクションした。翌日10 cmディッシュ10枚に植え継ぎ、翌々日からZeocin 1 mg/mlを含む選択培地で培養した。Zeocinに耐性を持つクローン化細胞を、オキシトシンまたはバゾプレッシンによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を指標にスクリーニングし、オキシトシン受容体安定発現細胞株とバゾプレッシン受容体安定発現細胞株を得た。CHO細胞の培養は10% FBS、0.1% Penicillin/Streptomycin、0.5% Zeocinを添加したF-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12)を用いて細胞培養プレート中で行った。CO₂インキュベーターの温度は37°C、CO₂濃度は5%に設定し、継代は3~4日毎に行った。

3-3. 受容体結合実験 培養した細胞を受容体結合実験用buffer(50 mM Tris-HCL (pH 7.4)、10 mM MgCl₂)に回収後超音波処理し、18000 rpm 4 °Cで20分間遠心して膜分画を回収し、-80 °Cに保存した。タンパク質濃度はBradford法によって計測した。膜分画の使用量はK_d値付近の濃度である1 nMの放射性リガンドが単独で結合する際に1000~2000 cpmになるように調整した。受容体結合実験では、96-well plateに非放射性リガンド50

μL、放射性リガンド 50 μL、膜分画 100 μL を入れ、室温で1時間インキュベーションした。Filter Mate Harvester (Perkin Elmer) を用いて Glass filter 上に膜分画を回収、洗浄後、一晚乾燥させ、液体シンチレーションカクテル Ultra Gold MV を 50 μl/well で加えて TopCount NXT (Perkin Elmer) で計測した。

3-4. 副腎ステロイドホルモン分泌刺激試験 ACTH を腹腔内投与し 60 分後に尾採血して血清を分離した。ステロイドホルモン分泌能を遺伝子改変動物と野生型にて検討した。

3-5. 血中ホルモン濃度測定 細胞上清や血液よりステロイドホルモン、Atrial natriuretic polypeptide を抽出しそれぞれ LC-MS 法、ELISA 法により測定した。

3-6. 副腎の組織学的検索 細胞、副腎組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後凍結切片を作製した。切片では未染色で或はヘマトキシリンエオジン染色の後封入し、光学顕微鏡で観察した。蛍光観察には緑色フィルターを用いた。また、ホルマリン固定パラフィン切片 (3 μm) をヘマトキシリンエオジン染色後、副腎皮質の厚さ (N=3) を計測し比較検討した。

3-7. RT-PCR 細胞、副腎組織から ISOGEN (日本ジーン) を用いて total RNA を抽出し、Oligotex dT-30 (Takara) を用いて mRNA を精製した。抽出した mRNA をサンプルとして、逆転写反応により cDNA を合成し、任意に作製した PCR プライマーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動した。PCR プライマーは、遺伝子の完全長 cDNA 配列をもとに作製した。

3-8. DNA チップによる遺伝子発現解析 副腎組織から ISOGEN (日本ジーン) を用いて total RNA を抽出し、Oligotex dT-30 (Takara) を用いて mRNA を精製した。精製した mRNA をサンプルとして、One cycle target labeling

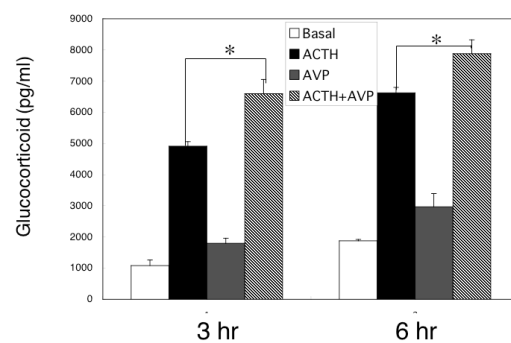
and control reagent kit (Affymetrix) を用いて標識 cDNA を調製した。Genechip DNA アレイ (mouse Genome 430 2.0 array) にハイブリ、洗浄後、Scanner で蛍光強度を測定した。各クローンの蛍光シグナル強度は、Bioconductor、gcRMA 解析によりグローバル補正した。蛍光シグナル強度比が 2.0 以上の場合に発現上昇を認めるとし、0.5 以下の場合に発現低下を認めるとした。

3-9. 倫理面への配慮 当研究はヒトの検体を取り扱わなかった。実験動物を用いた実験においては大学に設置する動物実験倫理委員会と遺伝子組換え実験の承認を受け実施した。

4. 研究成果

副腎由来細胞株における Vasopressin の作用をあきらかにするために、Y1 細胞を ACTH 単独、または ACTH と Vasopressin (100nM) の共存下で刺激すると、ACTH 単独よりもステロイドホルモンの分泌が亢進することが示さ

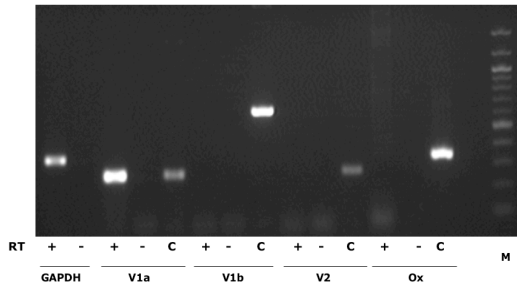
図1 Y1細胞におけるバゾプレッシンの糖質コルチコイド分泌亢進作用 (n=7)



れた。(図1参照)。

この亢進は3時間後には有意な上昇となり6時間まで持続した。発現解析によりこの細胞には V1a 受容体が発現し、他のバゾプレッシンファミリー受容体である V1b, V2, オキシトシン受容体は存在しないことが示された。(図2参照)

図2 副腎皮質細胞由来Y1細胞における
バズプレッシン受容体ファミリーの発現

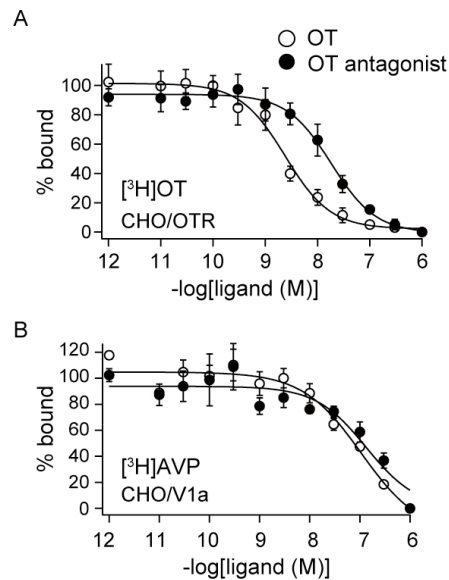


よって副腎皮質細胞に存在する V1a 受容体は単独で、或は MC2 メラノコルチン受容体と共同で糖質ステロイドの分泌を亢進させる能力を有することが明らかとなった。さらに、V1a 受容体を生体内で刺激し得るリガンドとしてバズプレッシンとオキシトシンが常に考えられるため、マウス V1a 受容体に対するバズプレッシンとオキシトシンの親和性を受容体安定発現細胞で検討した。すなわち、図3に示す如く、トリチウム標識オキシトシンのオキシトシン受容体に対する結合は、未標識のオキシトシンまたはオキシトシン受容体拮抗薬(Mpomeovt)によって競合的に拮抗された。この競合的結合における IC₅₀ 値はオキシトシン、オキシトシン拮抗薬それぞれ、2.4 ± 0.4 nM、19 ± 2 nMであった。一方、V_{1a}受容体を発現する細胞を用いた場合、トリチウム標識バズプレッシンの結合を阻害するオキシトシンの IC₅₀ 値は 107 ± 81 nM、拮抗薬の IC₅₀ 値は 133 ± 146 nMであった。よってオキシトシン、オキシトシン受容体拮抗薬共に V1a よりもオキシトシン受容体に対して 50 倍以上の親和性を有することが明らかとなった。

図3 受容体を安定的に強制発現する CHO細胞を用いた結合実験

オキシトシン受容体 (A) または V1a 受容体を安定発現する細胞より膜分画を調整し、異なる濃度の未標識オキシトシン (○) または未標識オキシトシン拮抗薬 (●) の存在下に

において、トリチウム放射性標識オキシトシン (A) またはトリチウム放射性標識バズプレッシン (B) が、受容体に結合する様式を解析した (n = 5)。グラフの Y 軸は、標識化合物のみが存在する場合の結合量を 100% とし、結合量の相対値を示す。OT はオキシトシン、AVP はバズプレッシンを、CHO/OTR はオキシトシン発現細胞、CHO/V1a は V1a 発現細胞を示す。



V1a の役割を個体レベルで評価するためノックアウトマウスの副腎皮質ホルモン分泌機能について解析したところ、有意にコルチコステロンの分泌が低下していたことを我々は先に報告している。V1a^{-/-}マウスでは基礎値の血中 Corticosterone 濃度に変化がないものの、adrenocorticotropine (ACTH) で刺激した際の分泌反応が有意に低下していた。副腎皮質組織像。副腎皮質の3層構造(顆粒層、束状層、網状層)、特に束状層と網状層の境界が不鮮明となっていた。しかし副腎髄質のカテコラミン分泌は保たれており V1a 遺伝子が皮質特異的な発達に重要であることを示している。さらに V1a^{-/-}マウスでは皮質に Lipofuscin 様蛍光物質の蓄積が観察された。さらにパラフ

イン切片にて詳細に層構造を観察したところ、野生型マウスでは束状帯で淡明細胞がみられたが、V1a^{-/-}では減少していた。またV1a^{-/-}マウスでは、淡明細胞が少ないため束状帯と網状帯との境界が不明瞭であった。皮質(P=0.75)と球状帯(P=0.69)の厚さでは有意な差は認められなかった。V1a受容体とホモロジーの高いV1bサブタイプ受容体ノックアウトマウスでは、バゾプレッシンによるACTH分泌が起こらないことが判明しているが、副腎皮質の層構造は保たれていた。副腎における自家蛍光の経時変化は、V1a^{-/-}副腎では生後11週令で野生型の40週令より多くの自家蛍光物質沈着を認めた。また、V1a^{-/-}は副腎のみならず心筋にも自家蛍光物質の沈着とHE染色で深紅に染まるリポフスチン顆粒を含む事が判明した。これらの時系列変化を念頭に自家蛍光が少ない8週令のV1a^{-/-}及び野生型マウスを用いてDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、に示す如く結果を得た。これら遺伝子については今後検索を進める。

Table 1. Genechip analysis identified up- and down- regulated transcripts in V1a^{-/-}-adrenal. Up regulated in KO

Unigene ID	GeneSymbol	GeneName	KO/KO	WT/KO
Mm.291131	Fbxo39	F-box protein 39 serine (or cysteine) preptidase	-0.07	-5.77
Mm.347501	Serpina1b	inhibitor, clade A, member 1b glucagon-like peptide 1	-0.25	-5.36
Mm.140772	Gip1r	receptor	-0.28	-3.06
Mm.29564	Mmp2	matrix metalloproteinase 2	-0.32	-2.56

Down regulated in KO

Unigene ID	GeneSymbol	GeneName	KO/KO	WT/KO
Mm.291504	Adi1	acireductone dioxygenase 1 abhydrolase domain containing	-0.01	5.71
Mm.80532	Abhd1	1	0.37	4.07
Mm.40802	Rbm28	RNA binding motif protein 28	0.45	2.81
Mm.41077	Act16a	actin-like 6A	0.08	2.35

Values are from three Genechip hybridizations, performed independently.

Natl Acad Sci U S A, 2006)、この受容体が副腎皮質機能に必須であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

1. Fujiwara Y, Tanoue A, Tsujimoto G, and Koshimizu TA. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: a review of studies on V1a receptor knockout mice. *Clin Exp Nephrol* 16: 30-34, 2012.
2. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choquet H, Besnard P, Lecoeur C, Vivequin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffeis C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Korner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Levy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatsi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuk I, Tsujimoto G, and Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* 483: 350-354, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

興水崇鏡 (KOSHIMIZU TAKA-AKI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20392491

(2) 連携研究者

土屋裕義 (TSUCHIYA HIROYOSHI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：80508755

[結論] 生後8週の早期より未知の機構により副腎皮質に加速的に加齢変化が進行しホルモン分泌能の低下を来すV1aバゾプレッシン受容体遺伝子改変マウスをモデルに (Proc